

А.Е. Антушевич<sup>1</sup>, А.Н. Гребенюк<sup>2</sup>, А.Г. Климов<sup>3</sup>,  
А.А. Ярцева<sup>3</sup>, В.Г. Антонов<sup>1</sup>, А.В. Болехан<sup>1</sup>, Е.Г. Богданова<sup>1</sup>

## Противолучевая активность препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

**Резюме.** В экспериментах на белых беспородных мышцах, подвергнутых острому внешнему воздействию гамма-излучения, и в исследованиях на клеточной культуре A431 изучена противолучевая активность и возможный механизм фармакологического действия препаратов окисленного глутатиона. В качестве противолучевых средств исследовали глутоксим, моликсан и литан, которые вводили мышам внутривенно через 1, 24, 48 и 72 ч после облучения. Влияние дисульфидов глутатиона на состояние костномозгового кроветворения оценивали по количеству эндогенных колоний, выросших на селезенках мышшей-самцов BALB/c на 9 сут после облучения, об интенсивности пролиферации клеток костного мозга и уровне биосинтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты судили по включению <sup>3</sup>H-тимидина. Для изучения возможных механизмов фармакологической активности дисульфидов глутатиона применяли модель *in vitro* с использованием специализированной клеточной культуры A431, а также оценивали содержание интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-4 и эпидермального фактора роста в сыворотке крови лабораторных животных. Показано, что облучение в дозе 7,3 Гр приводит к гибели 80% мышшей. Применение препаратов дисульфидов глутатиона – глутоксима, литана и моликсана – в дозах 30 мг/кг в качестве средств терапии острых лучевых поражений снижает летальность облученных животных на 50–60%. Противолучевой эффект препаратов окисленного глутатиона может быть обусловлен их способностью ускорять репаративные процессы в клетках костного мозга, стимулировать продукцию зрелых клеток крови и восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов гемопоэтических цитокинов. Препараты дисульфидов глутатиона оказывают стимулирующее влияние на рецептор эпидермального фактора роста, что проявляется в активации процессов фосфорилирования экстракционно регулируемых киназ 1, 2.

**Ключевые слова:** облучение, радиопротектор, окисленный глутатион, дисульфиды глутатиона, фармакологические эффекты, цитокины, интерлейкин-1, интерлейкин-4, эпидермальный фактор роста, рецепторы.

**Введение.** Вследствие расширения контактов с источниками ионизирующих излучений, возможности повторения аварийных ситуаций на объектах атомной энергетики, продолжения космических полетов риск переоблучения организма постоянно возрастает. Несмотря на разработку многочисленных лекарственных препаратов и биологически активных добавок для профилактики и лечения различных форм радиационных поражений, проблема поиска новых фармакологических средств противорадиационной защиты человека по-прежнему остается актуальной.

При острой лучевой болезни судьба облученного организма определяется прежде всего глубиной и длительностью лейко- и тромбоцитопении, которые, в свою очередь, зависят от величины сохранившегося после облучения пула стволовых клеток. В основе патогенетической терапии лучевой гемодепрессии лежит применение цитокинов [5, 7].

Однако одним из лимитирующих фармакологическую активность факторов является десенситизация соответствующих рецепторов к цитокинам, в качестве которых выступают эти регуляторы гемопоеза [6, 8, 9]. В последние годы внимание исследователей обращено на применение в качестве противолучевых средств эндогенных регуляторов тиол-дисульфидного обмена, в частности фармакологическим средствам, которые

содержат окисленный глутатион и обладают способностью восстанавливать чувствительность кроветворных клеток к гемопоэтическим цитокинам [5, 10].

**Цель исследования.** Провести сравнительную оценку противолучевой активности фармакологических препаратов, содержащих соли окисленного глутатиона.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на белых беспородных мышцах-самцах и линейных мышцах BALB/c массой 20–22 г. При моделировании острых радиационных поражений животных подвергали общему однократному гамма-облучению на установке «ИГУР-1» при мощности дозы 1,4–1,22 Гр/мин. Доза облучения составляла 7,3 Гр, что соответствовало 80% летальной дозе при 30-суточном наблюдении (ЛД<sub>80/30</sub>). Контроль поглощенной дозы проводили с помощью дозиметра «ИД-11».

В качестве противолучевых средств исследовали глутоксим, моликсан и литан. Глутоксим является фармакологическим аналогом окисленного глутатиона. Действующее вещество глутоксима – бис-(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин динатриевая соль. Моликсан – органическая соль дисульфида глутатиона и инозина. Его действующее вещество – инозина гли-

цил-цистеинил-глутамат динатриевая соль (рибофурозил-гипоксантина-глицил-цистеинил-глутамата динатрия). Литан является дилитиевой солью дисульфида глутатиона. Действующее вещество литана – бис-(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин дилитиевая соль. Препараты вводили мышам внутрибрюшинно через 1, 24, 48 и 72 ч после облучения.

Влияние дисульфидов глутатиона на состояние костномозгового кроветворения лабораторных животных оценивали согласно методике эндогенного колониеобразования [15] по количеству колоний, выросших на селезенках мышей-самцов BALB/c на 9 сут после облучения в дозе 7,3 Гр.

Об интенсивности пролиферации клеток костного мозга и уровне биосинтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) судили по включению <sup>3</sup>H-тимидина, который вводили внутрибрюшинно из расчета 1 мкКи/г массы тела за 30–40 мин до эвтаназии животных. ДНК выделяли из костного мозга бедренных костей на 3-и, 9-е и 12-е сут после лучевого воздействия. Измерение радиоактивности ДНК производили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «RackBeta» фирмы «LKB» (Швеция). Радиоактивность ДНК характеризовали величиной удельной активности, которую выражали в количестве импульсов/мин/мг ДНК.

Содержание провоспалительного цитокина интерлейкина-1β (IL-1β), противовоспалительного цитокина IL-4 и эпидермального фактора роста (ЭФР) в сыворотке крови животных определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа «ELISA» фирмы «Endogen» (Соединенные Штаты Америки) по прилагаемым к наборам описаниям процедуры. Концентрацию цитокинов рассчитывали в пг/мл по калибровочным кривым.

Для изучения возможных механизмов фармакологической активности дисульфидов глутатиона применяли модель *in vitro* с использованием специализированной клеточной культуры A431. Приготовление клеточных лизатов, электрофоретическое разделение, электроперенос, иммуноокрашивание

белков и удаление с мембраны связавшихся антител проводили по методике Е.Б. Буровой [4].

Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с расчетом среднего значения и ошибки среднего. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Показано, что как однократное, так и многократное (курсовое) введение глутоксима, моликсана или литана способствует сохранению жизни 60–70% облученных животных. Эффективность исследуемых веществ была практически сопоставимой.

Противолучевой эффект моликсана обусловлен ускорением репаративных процессов в клетках костного мозга и восстановлением необходимого пула кроветворных (стволовых и коммитированных) клеток костного мозга. Это подтверждается данными об увеличении почти в 2,5–3 раза количества стволовых клеток в методике эндогенного колониеобразования (табл. 1) и росту в среднем на 300% интенсивности включения меченого <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток костного мозга (табл. 2).

Подтверждением активации пролиферативных процессов в облученном костном мозге мышей, получавших моликсан, могут служить результаты экспериментов с <sup>3</sup>H-тимидином. Установлено, что у облученных животных на 3-и сут после лучевой травмы интенсивность включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток костного мозга была в 2 раза ниже, чем у необлученных животных. Однако на 9-е и 12-е сут после радиационного воздействия величина изучаемого показателя в 1,7 раза превышала его значения по сравнению с уровнем до облучения (см. табл. 2).

Выявлено, что все исследуемые препараты окисленного глутатиона при курсовом применении после облучения позволяют нормализовать процессы пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток, в первую очередь миелобластов и мегакариобластов, что обеспечивает восполнение пула клеток

Таблица 1

**Влияние моликсана на массу селезенки и число эндогенных колоний в селезенке мышей-самцов BALB/c на 9-е сутки после острого гамма-облучения в дозе 7,3 Гр**

Показатель	Количество животных	Масса селезенки, мг	Число эндогенных колоний
Облучение (контроль)	17	42,8±3,1	5,7±1,1
Облучение + моликсан	18	75,5±3,2*	14,6±1,8*

**Примечание:** \* – различия по сравнению с контролем (по критерию Стьюдента),  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Влияние моликсана на интенсивность включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток костного мозга мышей-самцов BALB/c, подвергнутых острому гамма-облучению в дозе 7,3 Гр, %**

Показатель	До облучения	После облучения, сут		
		3-и	9-е	12-е
Облучение (контроль), n=40	100±	55±	170±25	155±24
Облучение + моликсан, n=40	100±	145±23*	280±33*	350±48*

**Примечание:** \* – различия по сравнению с контролем (по критерию Фишера),  $p < 0,05$ .

периферической крови: не только лейкоцитов, но и тромбоцитов [1].

Согласно существующим в настоящее время представлениям, выраженность постлучевой гемодепрессии определяется состоянием систем пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга, активность которых находится под регуляторным контролем ЭФР и IL-1β (табл. 3).

Из таблицы 3 видно, что лучевое воздействие на животных контрольной группы сопровождалось увеличением в крови содержания ЭФР и IL-1β. Так, в плазме крови животных, облученных в дозе 4,5 Гр, содержание ЭФР увеличилось по сравнению с уровнем исходных величин в 1,5–1,8 раза. Уровень IL-1β повысился при этом более чем в 2 раза. В отличие от IL-1β содержание IL-4 повышалось в крови животных на пике лучевого синдрома лишь на 25–30%.

Казалось бы, повышение уровня ЭФР и IL-1β в крови животных, подвергшихся лучевому воздействию, является благом для организма и может свидетельствовать об активации репаративных процессов. Однако клинические наблюдения свидетельствуют об обратном: параллельно с ростом в крови животных концентрации исследуемых цитокинов увеличилась выраженность проявлений гемодепрессии. Применение моликсана в качестве средства лечения острых радиационных поражений значительно уменьшало выраженность клинических проявлений радиационных гематологических расстройств и способствовало нормализации концентрации изучаемых цитокинов.

Заметим, что основным компонентом исследуемых препаратов явился окисленный глутатион (GSSG), фармакологическим аналогом которого является глутоксим. Механизмы фармакологической активности глутоксима схожи с действием ряда цитокинов, но остаются до конца не выясненными. В этой связи на клетках A431 изучалось действие глутоксима на активность рецептора ЭФР, контролируемые им транскрипционные факторы STAT1 и STAT3, Ras-зависимые сигнал-передающие экстраклеточно регулируемые киназы (pERK) 1, 2 в сравнении с GSSG и ЭФР.

EGFR-рецепторная тирозинкиназа проявляет сродство к ЭФР и активность при образовании димера за счет дисульфидных связей. Глутоксим и GSSG стимулируют

EGFR при концентрациях 0,002–0,02 ммоль/л, что соответствует содержанию GSSG в межклеточной жидкости. Активность EGFR появляется через 5 мин после внесения исследуемых препаратов в среду инкубации и становится максимальной на 60-й мин. Действие глутоксима и GSSG на клетки сопровождается активацией pERK 1, 2, транскрипционного фактора STAT3, но не STAT1. Активация цитоплазматических белков носит волнообразный характер и определяется на 1-й, 4-й, 8-й, 16-й и 24-й ч после инкубации. Результаты исследований указывают на способность препаратов окисленного глутатиона восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов и соответственно чувствительность клеток к их воздействию [2, 4], что позволяет объяснить ряд фармакологических эффектов исследуемых средств действием эндогенных цитокинов.

Таким образом, противолучевой эффект препаратов окисленного глутатиона может быть обусловлен их способностью ускорять репаративные процессы в клетках костного мозга, стимулировать продукцию зрелых клеток крови и восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов гемопоэтических цитокинов.

В исследованиях *in vitro* на клеточной культуре A431 установлено, что моликсан, вносимый в инкубационную среду, вызывает стимуляцию рецептора ЭФР в течение 8 ч наблюдения. Характер активации рецептора выражается в небольшом (в среднем в 3 раза) повышении уровня фосфорилирования рецепторных белков в течение первых 5 мин с последующим снижением до контрольного значения к 30-й мин (первая волна). Затем следует возрастание активации (в среднем в 11 раз) через 1 ч с последующим снижением через 4 ч и достижением максимума через 8 ч (вторая волна).

Особый интерес представляют данные по изучению влияния моликсана на состояние внутриклеточных сигнал-передающих систем, в частности на активность pERK 1, 2, которые, по мнению M. Adachi et al. [11], G. Filomeni et al. [12], играют одну из ключевых ролей в процессах клеточной пролиферации.

Установлено, что динамика активации pERK 1, 2 в клетках A431 при действии моликсана в целом аналогична изменению выраженности процессов фосфорилирования рецепторов ЭФР: активация pERK 1, 2

Таблица 3

**Влияние моликсана на содержание ЭФР, IL-1β и IL-4 в крови белых беспородных мышей-самцов, облученных в дозе 4,5 Гр, пг/мл**

Показатель		До облучения	Сроки после облучения, сут	
			3-и	10-е
ЭФР	Облучение (контроль), n=20	4,2±0,54	6,7±0,58*	7,8±1,1*
	Облучение + моликсан, n=20		4,7±0,51#	4,9±0,43#
IL-1β	Облучение (контроль), n=20	59,4±6,2	78,9±8,1*	134,2±12,6*
	Облучение + моликсан, n=20		60,5±6,3#	67,1±6,7#
IL-4	Облучение (контроль), n=20	23,8±2,5	29,9±4,1	33,1±4,3*
	Облучение + моликсан, n=20		52,5±6,3#	60,5±6,3#

**Примечание:** \* – различия по сравнению с исходным уровнем; # – по сравнению с контролем (по критерию Стьюдента), p<0,05.

регистровалась через 5 мин, а затем через 4–8 ч после начала инкубации. Следовательно, моликсан оказывает стимулирующее влияние на рецептор ЭФР, что проявляется в активации процессов фосфорилирования сигнальных белков, в частности MAP-киназы pERK 1.

**Заключение.** Выявлено, что глутоксим и моликсан способствуют активации процессов фосфорилирования рецепторов ЭФР, что проявляется в активации сигнальных белков. Митогенактивируемый протеинкиназный каскад используется клеткой для регуляции транскрипционных генов в ответ на изменения в окружающей среде [13, 14]. В целом препараты дисульфидов глутатиона способны восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов и соответственно чувствительность клеток к воздействию цитокинов, что позволяет объяснить ряд их фармакологических эффектов действием эндогенных цитокинов.

### Литература

1. Антушевич, А.А. Экспериментальное изучение лечебной эффективности литиевой соли дисульфида глутатиона в условиях острого внешнего  $\gamma$ -облучения / А.А. Антушевич [и др.] // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 451–458.
2. Антушевич, А.А. Патологические основы эффективности глутоксида как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки / А.А. Антушевич [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № 3 (43). – С. 32–37.
3. Бузова, Е.Б. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом глутоксимом в клетках A431 / Е.Б. Бузова [и др.] // Докл. РАН. – 2005. – Т. 40, № 4. – С. 1–3.
4. Бузова, Е.Б. Активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 при окислительном стрессе в клетках A431 включает Src-зависимую трансактивацию рецептора EGF / Е.Б. Бузова [и др.] // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 5. – С. 466–477.
5. Гребенюк, А.Н. Противолучевые свойства интерлейкина-1 / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза. – СПб.: Фолиант, 2012. – 216 с.
6. Гребенюк, А.Н. Современные возможности медикаментозной профилактики и ранней терапии радиационных поражений / А.Н. Гребенюк [и др.] // Воен.-мед. журн. – 2011. – Т. 332, № 2. – С. 13–17.
7. Рождественский, Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств / Л.М. Рождественский // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 513–520.
8. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А.С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2018. – 512 с.
9. Солнцева, О.С. Роль цитокинов в осуществлении апоптотических процессов клеток иммунной системы у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации в малых дозах / О.С. Солнцева [и др.] // Иммунология. – 2000. – Т. 21, № 3. – С. 22–24.
10. Ярцева, А.А. Экспериментальное изучение механизмов гемостимулирующей активности органической соли дисульфида глутатиона и инозина в условиях острого радиационного воздействия / А.А. Ярцева, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. – 2016. – № 1. – С. 79–84.
11. Adachi, M. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism / M. Adachi [et al.] // J. Cell Biol. – 2000. – Vol. 148, № 4. – P. 849–856.
12. Filomeni, G. Cell signaling and the glutathione redox system / G. Filomeni [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2002. – Vol. 64. – P. 1057–1064.
13. Filomeni, G. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway / G. Filomeni [et al.] // FASEB J. – 2003. – Vol. 17. – P. 64–66.
14. Fernandes, A.P. Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system / A.P. Fernandes, A. Holmgren // Antioxid. Redox Signal. – 2004. – Vol. 6. – P. 63–74.
15. Till, J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E. Till, E.A. McCulloch // Radiat. Res. – 1961. – Vol. 14. – P. 213–222.

A.E. Antushevich, A.N. Grebenyuk, A.G. Klimov, A.A. Yartseva, V.G. Antonov, A.V. Bolechan, E.G. Bogdanova

### Anti-radiation activity of preparations containing glutathione disulfides

**Abstract.** Radioprotective activity and possible mechanism of pharmacological action of oxidized glutathione medicinal was studied in experiments on white inbred mice and on cell culture A431. Glutoxim, molixan and litan, which were administered intraperitoneally to mice 1, 24, 48 and 72 hours after irradiation, were examined as antiradiation agents. The effect of glutathione disulfides on the condition of bone marrow hematopoiesis was assessed by the number of endogenous colonies grown on the spleens of BALB/c male mice for 9 days after irradiation, the intensity of bone marrow cell proliferation and the level of Deoxyribonucleic acid biosynthesis were judged by the inclusion of  $^3\text{H}$ -thymidine. To study the possible mechanisms of the pharmacological activity of glutathione disulfides, an *in vitro* model was used using the specialized cell culture A431, and the content of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-4 and epidermal growth factor in the serum of laboratory animals was also assessed. It was shown that radiation at a dose of 7,3Gy resulted in the death of 80% of mice. The use of drugs containing glutathione disulfide – glutoxim, lithane and molixan in doses of 30 mg/kg as a means of treatment of acute radiation injuries reduced the mortality of irradiated animals by 50–60%. It was established that radioprotective effect of oxidized glutathione medicinal can be due to their ability to accelerate reparative processes in bone marrow cells, stimulate the production of mature blood cells and restore the functionally active conformation of hematopoietic cytokine receptors. Glutathione disulfide medicinals have a stimulating effect on the receptor of epidermal growth factor, which is manifested in the activation of phosphorylation processes of the Extracellularly regulated kinases 1, 2.

**Key words:** irradiation, radioprotector, oxidized glutathione, glutathione disulfides, pharmacological effects, cytokines, interleukin-1, interleukin-4, epidermal growth factor, receptors.

Контактный телефон: +7-921-946-52-70; e-mail: vmeda-nio@mil.ru